Analyse genetischer Komponenten der Wurzelentwicklung

M.-TH. HAUSER

Abstract:

The identification of regulatory genes for the differentiation of root cells is demonstrated using the model plant *Arabidopsis thaliana*. The „mutant analysis" method is documented including a discussion about its importance for future studies.

Pflanzen entwickeln verschiedenartigste Wurzelsysteme, die sie zur Wasser- und Nährstoffaufnahme aus dem Boden befähigen und in denen Energie in Form von Stärke bzw. Zucker gelagert wird. Anderseits dient die Wurzel als physikalische Stütze. Angepaßt an die unterschiedlichsten Bodenbedingungen und Funktionen (z.B. Verankerungs-, Speicher-, Wasseraufnahmefunktion) entwickelte sich im Laufe der Evolution eine faszinierende Vielfalt an Wurzelsystemen.

Diese oft weitverzweigten, unterschiedlich geformten Wurzelsysteme entwickeln sich meist aus der Keimwurzel oder Primärwurzel durch Bildung von Sekundär- oder Lateralwurzeln und durch Formveränderungen (Speicherwurzeln). Die primäre Wurzel hat ihren Ursprung in der pflanzlichen Embryonalentwicklung im Samen. Ihre Architektur ist typisch für die jeweilige Pflanze und genetisch determiniert. Andererseits entwickelt sich der Großteil des Wurzelsystems postembryonal und kann stark von Umwelteinflüssen bzw. der Bodenbeschaffenheit beeinflußt werden. Zusätzlich zu den umweltabhängigen Stimuli wie Bodendurchlässigkeit, Verfügbarkeit von Wasser, etc., die die Anzahl und die Plazierung der Lateralwurzeln dramatisch beein-

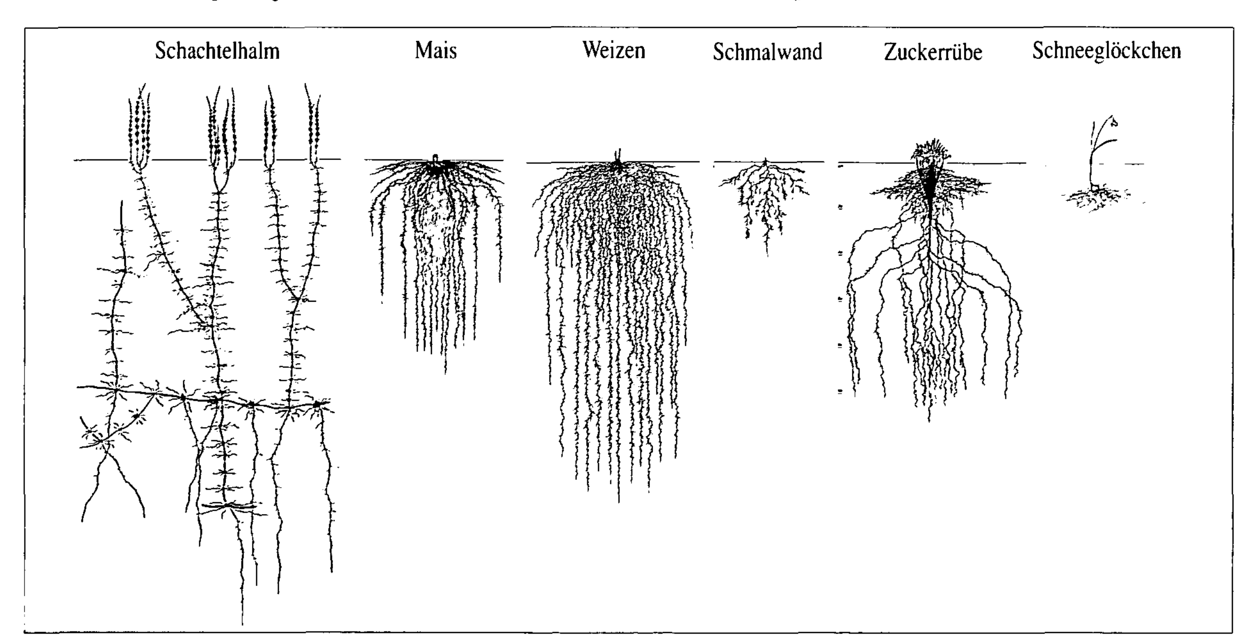


Abb.1: Größen- und Wurzelsystemvergleich von Schachtelhalm (*Equisetum* spp.), Mais (*Zea mays*), Weizen (*Triticum aestivum*), Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*), Zuckerrübe (*Beta vulgaris*) und Schneeglöckchen (*Galanthus nivalis*) modifiziert übernommen von L. KUTSCHERA (1960).

flussen, gibt es vererbbare Mechanismen, mit denen diese Stimuli empfangen und weitergeleitet werden. Diese genetisch regulierte Plastizität des Wurzelsystems kann als eine der Strategien gesehen werden, mit der die Pflanze ihre Unfähigkeit, sich zu den Nährstoffen hin- oder von ungünstigen Bedingungen wegzubewegen, überwindet. Diese Eigenschaft des Wurzelsystems ist von großer ökonomischer und landwirtschaftlicher Bedeutung und beeinflußt die Produktivität auch der oberirdischen Teile der Pflanze dramatisch.

Entwicklungsgenetik — Mutantenanalyse

Viele Daten sind über die unterschiedlichen Wurzelsysteme und ihren morphologischen Aufbau sowie die typischen Differenzierungsmuster der einzelnen Wurzelgewebe gesammelt worden (KUTSCHERA 1960, KUTSCHERA & LICHTENEGGER 1982, WAISEL et al. 1991). Doch die genetische Grundlage dieser Vielfältigkeit ist noch weitgehend unbekannt.

So versucht die moderne Entwicklungsgenetik, Gene zu charakterisieren und zu isolieren, die die Architektur der Embryonal- und Primärwurzel regulieren, das Wachstum (Zellteilung und Zellstreckung) anregen oder die Produktion von Lateralwurzel initiieren. Da die Wurzelmorphologie durch die Summe der verschiedenen Zellformen bestimmt wird, ist auch die Regulation der einzelnen Zellformen von fundamentalem Interesse. Weiters haben sich die Entwicklungsgenetiker zum Ziel gesetzt, die genetischen Mechanismen der Zelldifferenzierung, die mit der morphologischen sowie biochemisch-physiologischen Spezialisierung der Zelle einhergehen, aufzuklären.

Gene, die eine regulatorische Funktion haben, sind meist nur während eines kurzen Zeitraums in wenigen Zellen aktiviert und können daher nur schwer mit klassischen biochemischen Methoden isoliert werden. Die Entwicklungsgenetiker spüren diese regulatorischen Gene über deren Funktionsveränderung bzw. -zerstörung, die durch induzierte Mutationen gesetzt wird, auf. Das Prinzip der Mutantenanalyse basiert auf folgender Annahme: Wenn ein Gen durch eine Mutation zerstört oder in seiner Funktion verändert wird, kann über den Phänotyp dieser Mutante auf die Funktion des Gens geschlossen werden. So bewirkt ein Gen, welches für die gerichtete Zellelongation der Wurzelzellen verantwortlich ist, bei seinem Ausfall eine veränderte Zellform und somit Wurzelmorphologie. Gene, die für die Seitenwurzelbildung verantwortlich sind, bewirkten bei ihrem Ausfall „seitenwurzellose" Pflanzen (CELENZA et al. 1995, HETZ et al. 1996).

Die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*

Da die Mutationsanalyse ein aufwendiges Verfahren ist und klassische Mendel'sche Genetik mit molekularbiologischen und zellbiologischen Analysen benötigt, wurde auf internationaler Ebene 1990 ein Genomprojekt für eine genetisch leicht analysierbare Modellpflanze, *Arabidopsis thaliana* (Schmalwand) initiiert. Diese Wildpflanze ist mit den Kohlgewächsen (*Brassicaceae*) verwandt und blüht im Mai an Bahndämmen und auf kargen Böden auch in Österreich. Sie hat eine kurze Generationszeit von maximal 3 Monaten und, da sie sehr klein (max. 30 cm hoch) ist und ca 3 cm^2 Bodenfläche pro Pflanze benötigt, können unter beengten Laborbedingungen bis zu 4—5 Generationen pro Jahr gezüchtet und analysiert werden.

Ein Vorteil gerade *Arabidopsis thaliana* in großangelegten Mutantenanalysen für die Aufklärung der molekularen Komponenten der Wurzelentwicklung zu verwenden, ist ihre außerordentlich einfache Wurzelarchitektur (siehe Abb. 3). Zusätzlich begünstigt ihre leichte Kultivierbarkeit im Labor und die Transparenz ihrer Wurzeln (siehe Abb. 5) die Suche nach Wurzelmutanten. Außerdem läßt ihr kontinuierliches und undeterminiertes Wurzelwachstum die Beobachtung von Zellteilung, -streckung und -differenzierung über die gesamte Generationsdauer zu.

Um das Wurzelwachstum gut beobachten zu können, werden die Keimlinge unter sterilen Bedingungen auf vertikalen Agarnährböden in Petrischalen kultiviert. Abweichungen vom normalen Wurzelwachstum können unter diesen Wachstumsbedingungen sehr leicht detektiert und analysiert werden. Zusätzlich kann durch genau definierte Veränderungen der Nährbodenzusammensetzung deren Einfluß auf das Wurzelwachstum studiert werden.

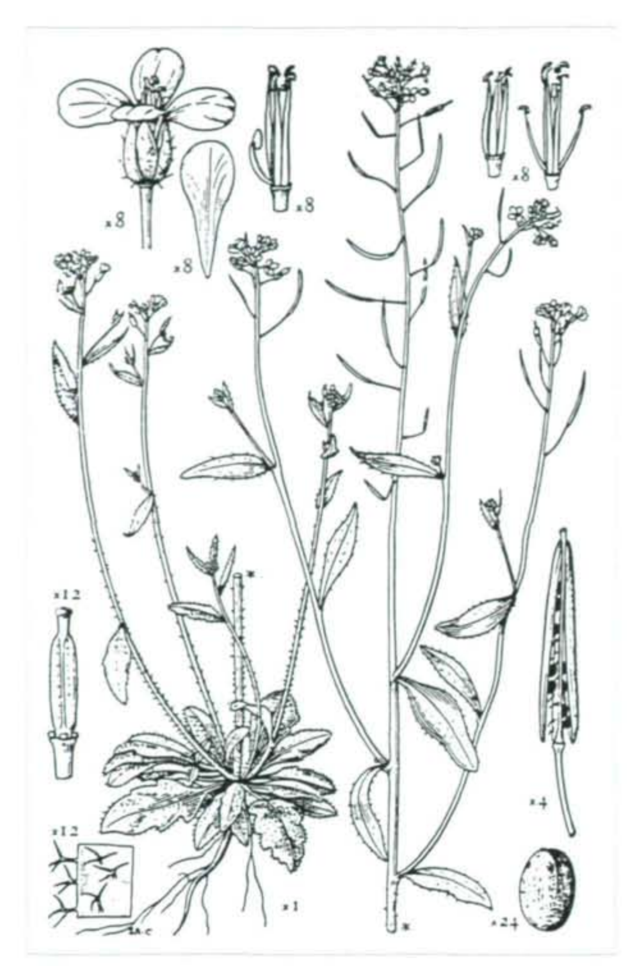


Abb. 2: *Arabidopsis thaliana* (Schmalwand, Acker-Schmalwand) wird 5 - 30 cm hoch (B), besitzt eine grundständige Blattrosette (A). Die Blätter sind länglich und ca. 2-3 cm lang. Die Kronblätter sind 2-4 mm lang und weiß. Bis zu 40 Samen sitzen in 1-2 cm langen Schoten, die waagrecht bis aufrecht abstehen (B). *Arabidopsis thaliana* wächst auf mageren Böden und sind kalkmeidend. Ursprünglich wahrscheinlich aus dem Himalaya-Gebiet stammend, ist sie in Europa sowie in Amerika, Australien, Nord-und Südafrika sowie Asien weit verbreitet. Die Größenangabe entspricht 1 cm.

Die Architektur der *Arabidopsis thaliana* Wurzel

Der Ursprung der typischen Wurzelarchitektur ist schon im Embryo festgelegt (SCHERES et al. 1994). In dieser frühen Entwicklungsphase der Pflanze bilden sich zwei Stammzellpopulationen (Meristeme) an den apikalen und basalen Polen des Embryos. Zusammen mit postembryonal angelegten Lateralmeristemen produzieren die basalen Stammzellen das gesamte Wurzelsystem und die apikalen alle oberirdischen Teile der Pflanze.

Die Stammzellen des primären Wurzelmeristems befinden sich - geschützt durch die Wurzelhaube - an der Spitze der Wurzel und sind in Zellringen radial organisiert. Durch transverse Teilungen produzieren diese Initialzellen Zelllinien, die nach einer Phase der Zellstreckung in die verschiedenen Wurzelgewebe (i.e. Epidermis- od. Rhizodermis-, Cortex-, Endodermis-, Perizykel-, Stelezellen) differenzieren (siehe Abb. 3A, B).

Bei *Arabidopsis thaliana* bestehen die vier äußeren Wurzelgewebe (Epidermis, Cortex, Endodermis und Perizykel) nur aus jeweils einer Zellschicht. Da die postembryonal gebildeten lateralen Wurzelmeristeme ähnlich dem primären Wurzelmeristem aufgebaut sind, und sich die meisten Wurzelgewebe durch transverse Teilungen vermehren, ist die Anzahl der Zelllinien pro Gewebe konserviert. Eine typische *Arabidopsis*-Wurzel besteht im Querschnitt aus ca. 19 Epidermiszellen, je acht Cor-

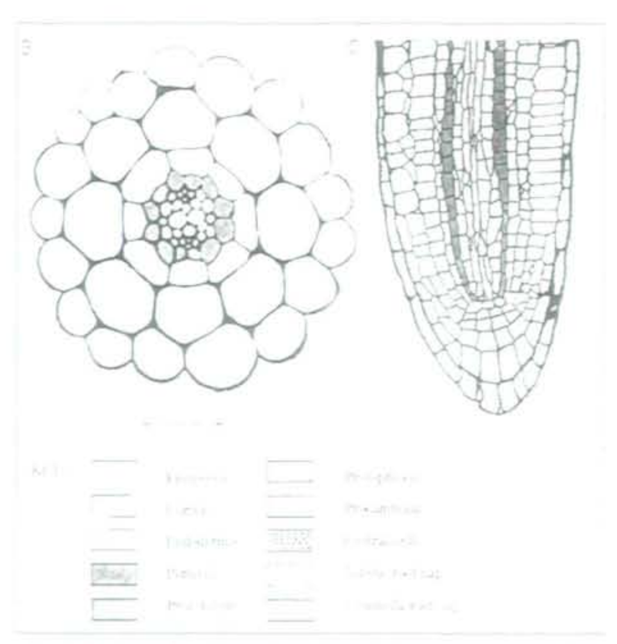


Abb. 3.: Schematische Darstellung des radialen (A) und longitudinalen Aufbaus (B) einer *Arabidopsis thaliana* Wurzel. A) Transverser Schnitt ca. 1mm hinter der Wurzelspitze. B) Longitudinaler Schnitt durch eine Wurzelspitze. Die verschiedenen Zelltypen sind mit unterschiedlichen Graustufen markiert. Der Größenvergleich entspricht 25µm. (Darstellung wurde adapiert nach DOLAN et al. 1993)

tex- und Endodermis- sowie 12 Perizykelzellen. Die Gefäßbündelzellen (Stelezellen) bestehen aus ca. 28 Zellen, wobei der Xylem- und Phloemzellen diarch angeordnet sind (siehe Abb. 3A, DOLAN et al. 1993)

Da Pflanzenzellen aufgrund ihres Zellwandaufbaus starr miteinander verbunden sind, können größere Zellbewegungen nicht stattfinden. Diese Besonderheit bewirkt, daß für die Ausbildung der typischen Wurzelform die zeitliche Regulation der Zellteilung sowie die Regulation der Zellteilungsebene und die Orientierung sowie das Ausmaß der Zellstreckung die wichtigsten Parameter sind.

Wurzelentwicklungsmutanten

Mit Hilfe der Mutantenanalyse konnten nun einige Gene, die diese Parameter (Zellteilung und Zellstreckung) regulieren, identifiziert werden. Für die Initiation des Wurzelmeristems nach der Embryogenese konnten bisher zwei Gene, „root meristem less“ 1 und 2 (CHENG et al. 1995), charakterisiert werden. Andere sind für die radiale Organisation und die Bildung der Endodermis (DI-LAURENZIO et al. 1996, BENFEY et al. 1993) sowie für die Zahl der Gefäßbündel- und Cortexzellen (SCHERES et al. 1994, TORRES-RUIZ & JÜRGENS 1994) verantwortlich. Einige dieser Radialorganisationsgene sind gleichzeitig auch für die Erhaltung der Zellteilungsaktivtät des Wurzelmeristems verantwort- lich. Unlängst konnten ausschließlich für die postembryonale Wurzelentwicklung Mutanten isoliert werden, deren Zellteilung in allen Wurzelgeweben unvollständig ist. Diese Mutanten produzieren daher Wurzelzellen, die bis zu 32 Zellkerne besitzen (HAUSER & BENFEY 1996, HAUSER et al. 1997, HAUSER et al., in Vorbereitung). Auch konnten mit Hilfe der Mutantenanalyse Gene identifiziert werden, die bei der gerichteten Zellstreckung einzelner Wurzelgewebe (HAUSER et al. 1993, AESCHBACHER et al. 1995, HAUSER & BENFEY 1993, BASKIN et al. 1992) eine wichtige Rolle spielen, und andere, die die Initiation und Form von Wurzelhaaren (SCHIEFELBEIN & SOMERVILLE 1990, SCHNEIDER et al. 1997) regulieren.

Zellexpansionsmutanten

Beispiele solcher wurzelspezifischen und konditionaler Zellexpansionsmutanten von *Arabidopsis thaliana* sind in den folgenden Abbildungen (4 und 5) zu sehen.

Typisch für diese Wurzelexpansionsmutanten sind die stark verdickten und verkürzten Wurzeln, deren Ausprägung von Wachstumsbedingungen beeinflußt werden kann (HAUSER & BENFEY 1994, HAUSER et al. 1995) Der Sproß unterscheidet sich kaum vom Wildtyp, und das kann als Hinweis angesehen werden, daß die von der Mutation betroffenen Gene vorwiegend bei der Wurzelentwicklung eine Rolle spielen. Tatsächlich zeigen zwei Gene (pom pom 2 und cudgel) auch einen Effekt auf die Pollenfertilität und die Gene procuste1, pom pom1 und cudgel auf die Hypocotylelongation unter etiolierenden Keimungsbedingungen (Skotomorphogenese, HAUSER et al. 1995, DESNOS et al. 1996).

Obwohl die sechs verschiedenen Mutantenklassen äußerlich ähnliche Wurzelphänotypen ergeben, ist ihre innere Architektur unterschiedlich. So reguliert das Cobra Gen die Orientierung der Epidermiszellelongation. Daher entstehen bei seiner Mutation Epidermiszellen, deren Zellstreckung ausschließlich radial und nicht wie im Wildtyp longitudinal erfolgt (Abb. 5C und F). Inter-



Abb. 4: *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (A, wt) Keimlinge und sechs verschiedene gleichaltrige Wurzelexpansionsmutanten (B, lion's tail, C, cobra, D, procuste1, E, pom pom1, F, cudgel, G, pom pom 2), die auf vertikalen Agarnährböden elf Tage kultiviert wurden. Der Größenvergleich entspricht 1mm.

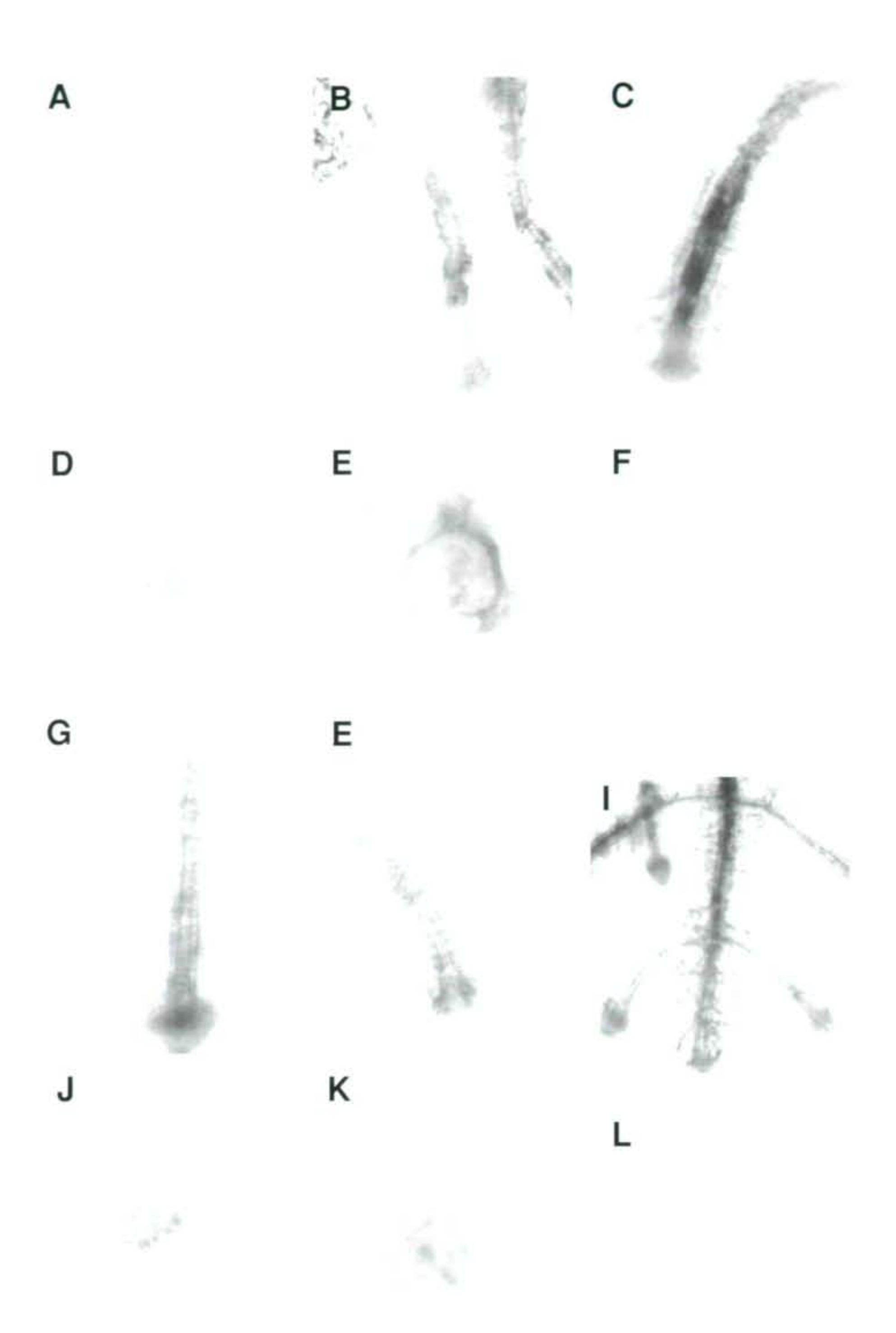


Abb. 5: Wurzelmorphologie von Wildtyp (A, D) und Wurzelexpansionsmutanten (B, C, E-L). Da die Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* durchsichtig sind, können ganze Wurzelspitzen (A, B, C, G, H, I) unter dem DIC (Differential-Interferenzkontast) Mikroskop photographiert werden. Mit Hilfe transversen Handschnitte (D-F, J-K) kann die radiale Organisation der Wurzeln verglichen werden. B und E stammen von der Mutante lion's tail, C und F von der Mutante cobra, G und J von der Mutante procuste1, H und K von der Mutante pom pom1 und I und L von der Mutante cudgel. Der Größenvergleich entspricht bei A-C und G-I 100µm und bei D-F und J-L 25µm.

essanterweise verändert sich das Zellvolumen der betroffenen Epidermiszellen nicht im Vergleich zu den Wildtyp Zellen. Im Gegensatz dazu zeigt die lion's tail Mutante in allen Zellgeweben ein dramatisch reduziertes Zellvolumen und nur die inneren Zellen der Wurzel, die Gefäßbündelzellen, sind radial expandiert (Abb. 5B und E). Die Mutanten pom pom1 und pom pom2 zeigen ebenfalls radial expandierte Zellen. Diesmal sind die zwei äußeren Zellschichten betroffen und auch das Zellvolumen dieser Gewebe ist erhöht (Abb. 5H und K). Im Vergleich dazu ist bei procuste1 (Abb. 5G und J) und cudgel (Abb. 5I und L) nur die Epidermis von dieser Volumszunahme betroffen. Dieses Gewebe zeigt auch bei diesen beiden Mutanten eine deutliche radiale Expansion. Bei allen Wurzelexpansionsmutanten ist im Vergleich zum Wildtyp jedes Gewebe von einer zwischen 66% - 95% reduzierten Zellstreckung betroffen. Dieser den Wurzelexpansionsmutanten gemeinsame Phänotyp ist auch die Ursache für ihre kurzen Wurzeln.

Betrachtet man also die entscheidenden Parameter der Zellsteckung, nämlich Orientierung und Ausmaß, so zeigen diese Mutanten, daß diese genetisch unterschiedlich und gewebsspezifisch reguliert werden. Diese über Mutantenanalyse identifizierten Gene geben wichtige Hinweise über die vererbbaren Komponenten der Zellformbildung einzelner Gewebe und somit auch über die genetische Regulation der gesamten Wurzelmorphologie.

Ausblick

Im Augenblick werden die meisten durch Mutation identifizierten Gene kloniert, um ihre molekulare Struktur aufklären zu können. Eines dieser Zellstreckungsgene Sabre, welches wesentlich für die Cortexzellelongation in *Arabidopsis thaliana* Wurzeln verantwortlich ist, zeigt keinerlei Homologie zu schon bekannten Genen (AESCHBACHER et al. 1995). Es konnten jedoch orthologe Gene in Reis, Gerste und Tabak detektiert werden. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis, daß die an der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* gewonnenen Erkenntnisse auch auf andere Pflanzen übertragen werden könnten. Daß diese Analogieschlüsse tatsächlich möglich sind, haben kürzlich Forschungsergebnisse an Blühinduktionsgenen gezeigt. In diesem Fall ist sogar ein Gen aus *Arabidopsis thaliana* in Aspen (*Populus tremula x tremuloides*) aktiv und kann, wenn es überexprimiert wird, die Blühinduktion dramatisch beschleunigen (WEIGEL & NILSSON 1995).

Mit der Identifizierung und Isolierung von entwicklungsregulierenden Genen, beginnt eine neue Ära, die es erlaubt, die Bildung der verschiedenen komplexen Wurzelsysteme und ihre Adapationsfähigkeiten auf Umwelteinflüße auf molekularer Ebene zu analysieren, verstehen zu lernen und dieses Wissen sinnvoll anzuwenden.

Zusammenfassung

An der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* wird demostriert, wie Gene mit regulatorischen Funktionen für die Zelldifferenzierung in Wurzeln identifiziert werden können. Die Methode der Mutantenanalyse wird vorgestellt und ihre Bedeutung für zukünftige Untersuchungen diskutiert.

Literatur

AESCHBACHER R.A., HAUSER M.-T., FELDMANN K.A. & P.N. BENFEY (1995): The SABRE gene is required for normal cell expansion in *Arabidopsis*. — Genes & Dev. **9**: 330-340.

BASKIN T.I., BETZNER A.S., HOGGART R., CORK A. & R.E. WILLIAMSON (1992): Root morphology mutants in *Arabidopsis thaliana*. — Aust. J. Plant Physiol. **19**: 427-438.

BENFEY P.N., LINSTEAD P., ROBERTS K., SCHIEFELBEIN J., HAUSER M-T. & R. AESCHBACHER (1993): Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. — Development **119**: 57-70.

BENFEY P.N. & J.W. SCHIEFELBEIN (1994): Getting to the root of plant development: the genetics of *Arabidopsis* root formation. — TIG **10**: 84-88.

CELENZA J.L.JR., GRISAFI P.L. & G.R. FINK (1995): A pathway

for lateral root formation in *Arabidopsis thaliana*. — Genes & Dev. **9**: 2131-2142.

CHENG J.-C., SEELEY K.A. & Z.R. SUNG (1995): RML1 and RML2, *Arabidopsis* genes required for cell proliferation at the root tip. — Plant Physiol. **107**: 365-376.

DESNOS T., ORBOVIC V., BELLINI C., KRONENBERGER J., CABOCHE M., TRAAS J. & H. HÖFTE (1996): Procustel mutants indentify two distinct genetic pathways controlling hypocotyl cell elongation, respectively in dark- and light-grown *Arabidopsis* seedlings. — Development **122**: 683-693.

DILAURENZIO L., WYSOCKA-DILLER J., MALAMY J.E., PYSH L., HELARIUTTA Y., FRESHOUR G., HAHN M.G., FELDMANN K.A. & P.N. BENFEY (1997): The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. — Cell **86**: 423-433.

DOLAN L., JANMAAT K., WILLEMSEN V., LINSTEAD P., POETHIG S., ROBERTS K. & B. SCHERES (1993): Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. — Development **119**: 71-84.

DOLAN L., DUCKETT C.M., GRIERSON C., LINSTEAD P., SCHNEIDER K., LAWSON E., DEAN C., POETHIG S. & K. ROBERTS (1994): Clonal origin and patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. — Development **120**: 2465-2474.

HAUSER M-T., DORNER M., FUCHS E, OVECKA M., BALUSKA F., BENFEY P.N. & J. GLOESSL (1997): Genetic evidence of post-embryonic and organ specific regulation of cytokinesis in roots of *Arabidopsis thaliana*. — 8th International Conference of Arabidopsis Research. Madison, Wisconsin. Abstract, 3-25.

HAUSER M-T. & P.N. BENFEY (1995): Genetic analysis of cell expansion in roots of *Arabidopsis*. — Keystone Symposium „Frontiers of plant morphogenesis". J. Cell. Biochem., Suppl. **21**A: 467.

HAUSER M.-T. & P.N. BENFEY (1994): Genetic regulation of root expansion in *Arabidopsis thaliana*. — In: PUIGDOMENECH P. & G. CORUZZI (eds.), NATO-ASI Plant Molecular Biology Series (New York) **81**: 31-40.

HAUSER M.-T., MORIKAMI A. & P.N. BENFEY (1995): Conditional root expansion mutants of *Arabidopsis*. — Development **212**: 1237-1252.

HETZ W., HOCHHOLDINGER F., SCHWALL M. & G. FEIX (1996): Isolation and characterization of rtcs, a maize mutant deficient in the formation of nodal roots. — Plant J. **10**: 845-857.

KUTSCHERA L. (1960): Wurzelatlas mitteleuropäischer Ackerunkräuter und Kulturpflanzen. —Frankfurt am Main.

KUTSCHERA L. & E. LICHTENEGGER (1982): Wurzelatlas mitteleuropäischer Grünlandschaften. — Stuttgart, Bd.1 und Bd.2.

SCHERES B., WOLKENFELT H., WILLEMSEN V., TERLOUW M., LAWSON E., DEAN C. & P. WEISBEEK (1994): Embryonic origin of the *Arabidopsis* primary root and root meristem initials. — Development **120**: 2475-2487.

SCHERES B., DILAUREZIO L., WILLEMSEN V., HAUSER M.-T., JANMAAT K., WEISBEEK P. & P. BENFEY (1995): Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects in embryonic axis formation. — Development **121**: 53-62.

SCHIEFELBEIN J.W. & C. SOMERVILLE (1990): Genetic control of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. — Plant Cell **2**: 235-243.

SCHNEIDER K., WELLS B., DOLAN L. & K. ROBERTS (1997): Structural and genetic analysis of epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* primary roots. — Development **124**: 1789-1798.

TORRES-RUIZ R.A. & G. JÜRGENS (1994): Mutations in the FASS gene uncouple pattern formation and morphogenesis in *Arabidopsis* development. — Development **120**: 2967-2978.

WAISEL Y., ESHEL A. & U. KAFKAFI (eds) (1991): Plant roots: the hidden half. — Marcel Dekker, Inc.

WEIGEL D. & O. NILSSON (1995): A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. — Nature **377**: 495-500.

Anschrift der Verfasserin:

Dr. Marie-Theres HAUSER
Zentrum für Angewandte Genetik
Universität für Bodenkultur Wien
Muthgasse 18
A-1190 Wien
AUSTRIA